مشخصات

کاربرد	تشخیص افتراقی باکتری بروسلا ابورتوس از بروسلا ملیتنسیس	
اساس تست	TaqMan ریل تایم PCR کیفی	
نوع نمونه	DNA ژنومی استخراج شده از باکتری بروسلا کشت داده شده	
اجزای کیت ۲۴ تستی	۳۶۰ میکرولیتر	Brucella Master Mix
	۱۰۰ میکرولیتر	Abortus Positive Control
	۱۰۰ میکرولیتر	Melitensis Positive Control
	۱۰۰ میکرولیتر	No Template Control
فلوروکروم‌ها	FAM (بروسلا آبورتوس)	
	HEX یا VIC (بروسلا ملیتنسیس)	
LOD	۱۰ کپی در واکنش	
دستگاه‌های ریل تایم PCR	MIC، Rotor Gene، LightCycler، Step One (Plus)	

شرایط حمل و نقل و نگهداری:
- حمل و نقل کیت در دمای زیر ۲۰- درجه سانتیگراد انجام شود.
- تمامی اجزای کیت تا زمان انقضای مندرج بر روی لیبل در دمای ۵ ± ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
- اجزای کیت نهایتا بعد از ۳ سیکل ذوب / فریز پایدار هستند.
- در صورت استفاده بیش از یکبار از کیت، پیشنهاد می‌شود از اجزای کیت الیکوت تهیه شود.
- در صورت نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، بهتر است آزمایشات در کمتر از یک هفته انجام شوند.
- تا حد امکان ریجنت حاوی پرایمر/ پروب در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.

هشدارها:
- هرگونه تغییرات در پروتکل پیش رو ممکن است باعث ایجاد خطا در نتایج حاصله شود.
- تست حاضر باید توسط افراد متخصص آموزش دیده و تحت شرایط GLP (Good laboratory practice) انجام شود.
- نتایج قابل اطمینان بستگی به جمع‌آوری، حمل، ذخیره و نگهداری مناسب نمونه و همچنین استخراج ژنومی صحیح دارد.
- کیت حاضر صرفا برای انجام تست بر روی ژنوم استخراج شده است.
- مهارکننده‌های موجود در حین استخراج DNA ژنومی می‌توانند مانع از تکثیر DNA هدف در حین انجام واکنش PCR شوند.

پروتکل

قبل از انجام تست تمامی اجزای کیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شوند تا به آرامی ذوب شوند. استفاده از کرایورک به منظور نگهداری محلول‌ها در این مرحله پیشنهاد می‌شود. سپس برای حل کردن و هموژن کردن محلول‌ها از **ورتکس** استفاده شود. در مرحله بعد، تمامی محلول‌ها اسپین شوند تا در صورتی که قطرات محلول روی درب تیوب‌ها باشد به ته میکروتیوب کشیده شوند.

مراحل:

۱ – در زیر یک ورک استیشن PCR، به ازای هر نمونه، مقدار **۱۵ میکرولیتر** از Brucella Master Mix را در یک چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) الیکوت نمایید.

۲- در زیر یک ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر DNA استخراج شده‌ی از نمونه‌ی کشت باکتری بروسلا را در به هر چاهک حاوی Brucella Master Mix اضافه و سپس اسپین نمایید.

- در این مرحله، بطور موازی مقدار **۵ میکرولیتر** از هر کدام از کنترل‌های مثبت Abortus Positive Control و Melitensis Positive Control و همچنین کنترل منفی No Template Control موجود در کیت را نیز به‌صورت جداگانه به ۳ چاهک دیگر حاوی میکس واکنش اضافه نمایید.

۳- پلیت یا استریپ حاوی میکس واکنش حاصل از مرحله‌ی قبل را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول روبرو را اجرا نمایید.

* خوانش فلوروسنت در کانال‌های FAM ، HEX و Texas Red در این مرحله انجام شود و در صورت نیاز Passive reference dye (ROX) در حالت خاموش قرار داده شود.

سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
۱ x	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۱۸۰
۴۰ x	باز شدن رشته‌های DNA الگو	۹۵	۱۵
	جفت شدن پرایمرها و سنتز رشته های جدید	۶۰	۳۰ *
۱ x	خنک شدن	۲۵	۳۰

آنالیز نتایج

- بعد از انجام PCR، هر نمونه باید بصورت مجزا مورد بررسی و آنالیز قرار گیرد. پیشنهاد می‌شود جهت بدست آوردن مقادیر دقیقتر Ct، ترشهلد (آستانه) از حالت اتومات خارج شود و خط ترشهلد (Threshold line) بصورت دستی تنظیم شود.
- منحنی‌های مشاهده شده برای هر کانال باید به‌شکل سیگموئیدی و یا دارای فاز لگاریتمی باشند.
- در هر یک از ۳ کانال FAM ، HEX و TxRed مقادیر Ct کمتر از ۳۴ بعنوان نتیجه‌ی مثبت و مقادیر بزرگتر از ۳۴ بعنوان نتیجه‌ی منفی نظر گرفته شوند.
- تفسیر نهایی نتایج بر اساس زیر انجام شود.

تفسیر	TxRed	HEX	FAM
وجود باکتری بروسلا ابورتوس	±	-	+
وجود باکتری بروسلا ملیتنسیس	±	+	-
عدم وجود باکتری بروسلا	+	-	-
استخراج ژنوم بدرستی انجام نشده است و یا احتمال حضور مهارکننده در نمونه وجود دارد (جواب تست نامعتبر است)	-	-	-

آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۳۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۹۱۲۵۵۸۷۸۵۸
وبسایت: www.deltabiotechno.com